AUS DEM II. ANATOMISCHEN INSTITUT
DER FREIEN UNIVERSITAET BERLIN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. WILLY SCHWARZ

DIE SPERMATIDENSTRECKUNG WAEHREND DER SPERMIOHISTOGENESE BEI RATTEN IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWUERDE
AN DEN MEDIZINISCHEN FACHBEREICHEN
DER FREIEN UNIVERSITAET BERLIN

VORGELEGT VON
AHMAD GHAZI
AUS NEYSCHABOUR / IRAN

1971

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.Willy S c h w a r z

" Die Spermatidenstreckung während der Spermiohistogenese bei Ratten im elektronenmikroskopischen Bild "

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ahmad G h a z i

aus Neyschabour / Iran

Referant: Professor Dr.med.Hans-Joachim M e r k e r

Korreferent: Professor Dr.med.Rudolf K a d e n

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28. Oktober 1971

Einleitung

Bei Durchsicht der morphologischen Literatur auf dem Gebiet der Spermatogenese und Spermiohistogenese fällt auf, daß eine Fülle von Veröffentlichungen und Resultaten vorliegen, die die Spermatogenese und die reifen Spermien betreffen. Diese Fortschritte waren wesentlich möglich, weil neue Methoden angewendet werden konnten. Für die Untersuchung der Generationsfolge der Spermienvorstufen und der Vorgänge während der Reifungsteilungen ist besonders die Autoradiographie geeignet (HILSCHER et al.1966,1969; ROOIJ and KRAMER 1968). Zur Darstellung und Beurteilung der Morphologie des fertigen Spermiums hat sich die elektronenmikroskopische Technik außerordentlich bewährt (BEDFORD 1966; FAWCETT and ITO 1965; FAWCETT and PHILIPS 1969; FAWCETT et al.1969; FUJITA et al.1970; HANCOCK 1970; HEALEY 1969; KAY and MASTER-KAY 1966; NICANDER and PLOEN 1969; NICANDER and BANE 1966; PEDERSEN 1969; QUINN et al. 1969; SAACKER and ALMQUIST 1964; VITALE-CALPE 1970; WODLEY 1970). Andererseits sind deutliche Lücken in unseren Kenntnissen sichtbar, die Vorgänge zwischen diesen beiden Gebieten betreffen: Die Feinstruktur und funktionelle Bedeutung der Zellstrukturen während der Spermiohistogenese, d.h. der Morphologie der Spermatiden. In dieser Periode entsteht aus einem Spermatocyten II. Ordnung durch tiefgreifende Formänderungen ein langgestrecktes Zellindividuum, das schließlich durch Ausbildung eines kontraktilen Systems in der Lage ist, sich

fortzubewegen im Sinne einer positiven Rheotaxis. Gleichzeitig spielen sich in der Zusammensetzung des Karyoplasmas und im Packungsmuster seiner Bestandteile wesentliche Umgestaltungen ab. Auch die übrigen Cytoplasmabestandteile gehen entweder verloren (endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) oder ordnen sich in ganz bestimmter Weise an (Mitochondrien, Centriolen) (Lit.siehe FAWCETT 1965; FAWCETT et al.1969; KAY and MASTER-KAY 1966; NICANDER and PLOEN 1969).

Weder morphologisch dargestellt noch in allen Einzelheiten diskutiert ist bei der Bearbeitung dieses Problemkomplexes der Vorgang der Streckung der Spermatiden. Nicht nur bei dieser speziellen Zellart, sondern auch bei anderen Beispielen sind die morphologischen Vorgänge während einer gerichteten und fixierten Streckung und ihre funktionelle Deutung durchaus noch umstritten. Einige Vorstellungen über Mechanismen, die solche Formänderungen nicht nur bewirken, sondern auch stabilisieren, sind allerdings bereits hin und wieder diskutiert worden. Diese Erklärungen umfassen einen weiten Bereich. So ist auf der einen Seite eine passive Verformung durch Druck bzw. Druckänderungen von außen als mögliche Ursache besprochen. Für die Spermatidenverformung kämen hierfür die SERTOLI-Zellen in Frage. Auf der anderen Seite wird diesem "passiven" ein "aktiver" Entstehungsmechanismus entgegengesetzt. Hier soll also ein Mechanismus innerhalb der Zelle vorhanden sein, der durch Druck und Zug die Zelle verformt (Lit. siehe STIEVE 1930). Dieser Mechanismus könnte einmal

einen kontraktilen Mechanismus betreffen, der durch lokale Kontraktionen Cytoplasma in eine bestimmte Richtung preßt. Damit wäre eine Ähnlichkeit mit der amoeboiden Bewegung gegeben (v.KEYSERLINGK 1970; WOHLFARTH-BOTTERMANN 1964). Er setzt ein kontraktiles System voraus. Diese Möglichkeit erklärt aber nicht die starre Stabilisierung der Spermienform. Ein zweiter "aktiver" Mechanismus zur Verformung annähernd runder Zellen in langgestreckte Zellen könnte auf der Entwicklung und Ordnung von sog. Microtubuli beruhen. Diese Vorstellung ist in Analogie zu Formänderungen und ihre Stabilisierungen bei anderen Zellarten berechtigt. So ist bekannt oder wird zumindest vermutet, daß u.a. die linsenformige Thrombocytenform, die spindeligen Vogelerythrocyten, das Axonauswachsen und die Ausrichtung der Myotuben durch das Microtubulisystem geprägt wird (BENSCH and MALAWISTA 1969; HEPLER and JACKSON 1968; HOLMES and CHOPIN 1968; OLAH 1969; RENAUD et al. 1968; SHELDANSKI and TAYLOR 1968; SOLL et al.1967; TILNEY and GIBBINS 1969; WARREN 1968; WHITE 1969).

Diese Möglichkeit käme aber nur dann in Betracht, wenn in den sich entwickelnden und verformenden Spermatiden derartige Microtubuli zu finden sind. Ohne Zweifel würden Microtubuli in den Spermatiden auf Grund ihrer mechanischen Eigenschaften die Formung eines Spermienschwanzes und die Fixierung dieser Form erklären. Bei anderen Zellarten konnte nämlich gezeigt werden, daß die Microtubuli in der Lage sind, eine formende Kraft auszuüben. Außerdem zeigen isolierte Microtubuli entweder nur flache Kurven oder sind recht- bis spitzwinkelig gebrochen.

Das spricht für eine gewisse Starrheit und einen Widerstand gegenüber mechanischen Einwirkungen (MERKER, persönliche Mitteilung).

Tatsächlich konnte in den Mittelstücken und in den Schwänzen von Spermien ein Microtubulus-System nachgewiesen werden. Es zeigt die typischen 9 peripheren Tubuluspaare und das zentrale Tubuluspaar, also eine Anordnung, die auch in den motilen Cilien (Kinocilien) vieler Flimmerepithelien zu finden ist. Allerdings beobachtet man bei Untersuchungen des Rattenhodens, daß eine Streckung der Spermatiden bereits dann eintritt, wenn der Microtubulus-Apparat noch nicht voll ausgebildet ist. So ist dieses Microtubulus-System vielleicht doch nicht für das Auswachsen des Schwanzes verantwortlich.

Unabhängig vom Mechanismus der Streckung ist die Prägung der Richtung, in welcher diese Streckung abläuft, ein wichtiges Problem bei der Spermatidenreifung. Ihre Entstehung ist noch völlig unbekannt. Natürlich liegt es nahe, die Stellung der Centriolen für diese Ausrichtung verantwortlich zu machen. Elektronenmikroskopisch läßt sich zeigen, daß zweifellos das schwanzwärts gelegene Centriol wichtig ist, da sich die Centriolen - Microtubuli kontinuierlich von hier aus in die Mittelstück- bzw. Schwanz-Microtubuli fortsetzen. Das kernnahe Centriol steht senkrecht dazu. Eine Beziehung zwischen Centriolenstellung und Verlauf des Tubulus-Systems besteht also sicher. Dadurch wird aber das Problem nur verschoben. Es muß jetzt gefragt werden, welcher Mechanismus die Stellung der Centriolen steuert.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Spermienzellreifung sind also noch eine Reihe von Problemen zu lösen, die entweder mit den bisherigen optischen Mitteln nicht sicher beurteilt werden konnten oder die bisher nicht genügend Berücksichtigung fanden. Nach den Kenntnissen, die an anderen Organen und Zelltypen bei verwandten Problemen bereits erarbeitet sind, kann angenommen werden, daß eine genaue elektronenmikroskopische Analyse bessere Deutungsmöglichkeiten der geschilderten Wissenslücken bringen müßte.

Wir untersuchten deshalb Hoden von Ratten mit der elektronenmikroskopischen Technik. Hier sollte besonders auf die Zeitspanne während der Spermio-Histogenese geachtet werden, in der aus einer völlig abgerundeten Zelle eine langgestreckte "geschwänzte" Zelle wird. Es handelt sich also um die Zeit nach Beendigung der 2. Reifeteilung bis zum Erreichen der typischen langgestreckten Spermienstruktur. Dabei sollte besonders darauf geachtet werden, ob in dieser Zeit Strukturen vorhanden sind, die eine Beantwortung folgender Fragen erlauben:

1. Wie richten sich die Centriolen bzw. später das Microtubulussystem innerhalb der Samenzellen aus?

2. Wie kommt es während der Spermatiden-Entwicklung zu der ausgeprägten Streckung und Schwanzentwicklung der Samenzellen?

Material und Methoden

Als Tiermaterial verwendeten wir einen Wistar-Stamm (PADERBORN Fw 68). Die Hoden von Rattenböcken im Alter von 6 bis 12 Monaten wurden sowohl per immersionem als auch per perfusionem fixiert. In beiden Fällen bestand die Fixierungslösung aus einem modifizierten KARNOVSKY-Gemisch: 3% Glutaraldehyd + 3% Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer. Für die Immersionsmethode wurde den Tieren der Hoden in Äthernarkose entnommen und sofort in der kalten (4^{o} C) Fixierungslösung zerschnitten. Dabei zerfällt das Hodengewebe in die einzelnen Tubuli semiferi, die dann isoliert eingebettet werden können. Die Fixierungsdauer betrug 2 - 4 Stunden. Für die Perfusionsfixierung wurde eine Kanüle via linker Ventrikel in die Aorta eingelegt und dann durchspült aus einem Gefäß, das etwa 1 m über der Ratte aufgehängt war. Nach einer Perfusionsdauer von 30 Minuten erfolgte auch hier die Entnahme, das Zerschneiden in kleine Stücke (1 x 1 mm) und das erneute Einlegen für 2-4 Stunden in die Fixierungslösung. Nach dem Waschen in der Pufferlösung schloß sich die sog. Nachfixierung in einer 1%igen gepufferten (0,1 M Cacodylatpuffer) OsO_4-Lösung für 1 Stunde an. Anschließend wurde in der Acetonreihe entwässert (30 - 50 - 75 - 90 % für je 1 Std und 100 % über Nacht und in Mikropal (Fa. FERAK, Berlin = Vestopal) eingebettet. Die Schnitte stellten wir an REICHERT- und LKB-Ultrotomen her. Als Kontrastierungslösung diente Uranylacetat und folgend Bleicitrat. Die Schnitte wurden auf Netz- und Großlochblenden aufgefangen, die mit Silikonöl-verstärkten Formvar-Filmen beschichtet waren. Die Herstellung der elektronenmikroskopischen

Aufnahmen erfolgte an Siemens Elmiskopen I und Ia bei einer Strahlspannung von 80 kV und einer Blendengröße von 200/50 u oder 100/30 u. Die Primärvergrößerung betrug 1500 bis 40000. Die Befunde wurden beurteilt und ausgemessen an $3\frac{1}{2}$ fach vergrößerten positiven Papierabzügen.

Zur Orientierung im Schnitt und Auswahl der günstigen Objektstellen wurden sog. Semidickschnitte hergestellt ($\frac{1}{2}$ - 1 u), die nach dem Antrocknen auf normalen Glasobjektträgern mit 50%iger wäßriger Giemsalösung für 1 Minute bei 60 ^{0} C gefärbt sind.

Befunde

Aus der Fülle der zu beobachtenden Reifestadien der Samenzellen und ihrer Strukturen sollen hier beschreibend nur diejenigen berücksichtigt werden, die für die Beurteilung unserer Probleme wichtig sind, also wesentlich die Spermatiden und später Spermatocyten II. Ordnung. - Am Beginn dieser Zeitspanne sind die Samenzellen deutlich polarisiert: 1. Auf der einen Seite des Kernes finden sich noch Reste des Golgi-Apparates mit einzelnen Vesikeln und der großen acrosomalen Vacuole, die sich bereits als flache Kappe um den noch runden Kern legt. Die Ausdehnung dieser enzymgefüllten Blase wechselt. Im Spitzenteil kann sie bis zu 0,75 µ breit sein, in den Seitenteilen dagegen durchschnittlich nur 0,1 µ. Es entsteht dadurch der Eindruck eines geschichteten Membransystems, zu dem von innen nach außen folgende Membranen gehören: 1. Innere Kernmembran, 2. äußere Kernmembran, 3. nach innen gelegene Acrosomenmembran, 4. nach außen gelegene Acrosomenmembran, 5. Zellmembran der Samenzelle, 6. Zellmembran der SERTOLI-Zelle. Häufig lagert sich in der SERTOLI-Zelle noch ein Hohlraum des glatten endoplasmatischen Retikulums ebenfalls kappenförmig um die Samenzelle herum, so daß weitere zwei Membranen zu diesem System dazukommen können. Der acrosomale Hohlraum und die dazugehörigen Membranen lassen sich gut von den übrigen "compartments" abgrenzen, da er ein feingranulares bis homogenes elektronendichtes Material enthält.

2. Der andere, entgegengesetzte Pol der Zelle ist charakterisiert durch das oder die beiden Centriolen. Sie liegen in der Nachbarschaft der Kernmembran genau gegenüber dem zentralen Acrosomenbereich. Ihre Achsenrichtung ist zunächst nicht sicher zu

bestimmen, da durch die geringe Schnittdicke und den regellos wechselnden Anschnittwinkel in der jetzt noch annähernd runden Zelle Schwierigkeiten bei der Konstruktion eines dreidimensionalen Bildes entstehen. Deshalb ist auch nicht sicher zu entscheiden, ob bereits 2 Centriolen vorhanden sind, wenn auch nur 1 Centriol im Bild erfaßt wird. Auf den eigentlichen Bildungsmodus des 2. Centriols aus noch ungeformtem elektronendichten Material in der unmittelbaren Umgebung des 1. Centriols soll hier nicht eingegangen werden.

Die Zahl der Zellorganellen in diesen Zellformen ist gering, ihre Verteilung noch fast regellos. Nur die Mitochondrien liegen an der Peripherie angedeutet konzentrisch um den Kern angeordnet. Im Kern finden sich keine besonderen Strukturen mehr. Die synaptinemalen Komplexe und auch die Nucleoli und andere karyoplasmatische Verdichtungen sind verschwunden. Der Kern enthält jetzt locker verteilt ohne besondere Verdichtungen feinfilamentäres und granuläres Material.

Im weiteren Verlauf der Reifung finden wir eine tiefgreifende Umgestaltung der Zellform, der Verteilung der Zellorganellen und ihrer Struktur. Auf der acrosomalen Seite der Zelle wird der Cytoplasmasaum schmaler und die darin bisher enthaltenen Zellorganellen strömen seitlich am Kern vorbei in das Cytoplasma der entgegengesetzten Seite. Dadurch kommen sich die weiter oben beschriebenen Membranen (Kern-, Acrosom- und Zellmembranen) noch näher und es entsteht der Eindruck eines Lamellensystems.

Im unsymmetrisch verdichten "Centriolenteil" der Zelle finden sich jetzt u.a. regellos verteilte Mitochondrien, in einem umschriebenen Gebiet lokalisierte kurze Hohlräume des glatten endoplasmatischen Retikulums, freie Ribosomen sowie einzelne Vesikel und dunkle Einschlüsse. Gleichzeitig nimmt der Kern eine angedeutet ovale Struktur an, ohne die Innenstruktur wesentlich zu verändern. Der Bereich in der Nähe der Centriolen bleibt abgeflacht und hier finden wir jetzt eine enge räumliche Beziehung zwischen Kern und Centriolen. Im Laufe der Entwicklung buchtet sich sogar dieser Centriolenbezirk etwas in das Karyoplasma ein. Das dem Kern am nächsten gelegene Centriol verläuft parallel zur Kernmembran, das weiter entfernt gelegene senkrecht dazu. Darüber hinaus scheint der Centriolenkomplex an der Kernmembran verankert zu sein. Zwischen äußerer Kernmembran und Centriol findet sich eine deutliche Verdichtungszone, von der aus zum Centriol bzw. zur äußeren Kernmembran feine, etwa 2o - 40 Å dicke Fäden ziehen. Solche Fäden und auch eine angedeutete Verdichtung des Grundcytoplasmas findet sich im gesamten Bereich des Centriolen-Komplexes. - Auf der vom Kern abgelegenen Seite entsteht jetzt eine membranbegrenzte Blase um den Centriolenkomplex. In dieser Blase wachsen die 9 peripheren und das eine zentrale Tubuluspaar aus. Dabei schieben sie die begrenzende Membran vor sich her und verformen so die Blase zu einem halbmondförmigen Gebilde, das dem auswachsenden Tubulussystem kappenförmig aufsitzt.

Während diese Vorgänge ablaufen, hat sich aber bereits die Zelle deutlich gestreckt und ein neues Strukturelement gebildet, das für diese Entwicklungsperiode ein charakteristisches elektronenmikroskopisches Bild bietet: Microtubuli in großer Zahl. Sie entstehen seitlich vom Kern und umfassen ihn sowie die unterhalb des Kerns lokalisierten Cytoplasmabereiche mit dem Centriolenkomplex manschettenförmig. Die Microtubuli beginnen in einer Zellmembranfalte, die etwas seitlich vom Acrosom den Spermienkopf ringförmig umzieht und ziehen gradlinig in Richtung des sich entwickelnden Spermienschwanzes. Hier reichen sie zunächst bis in die Höhe des Centriolenkomplexes, verlängern sich dann aber ein gutes Stück darüber hinaus. In voll ausgebildetem Zustand ist diese Microtubulimanschette etwa 4 bis 8 Schichten dick. Eine besondere Ordnung der Microtubuli ist aber nicht festzustellen. Die Microtubuli selbst haben etwa einen Gesamtdurchmesser von 350 Å und eine lichte Weite von 160 - 200 Å. Die Wandstärke beträgt 90 Å.

Nach Ausbildung der Microtubulimanschette spielen sich dann offenbar die Streckungsvorgänge sehr schnell ab. Im acrosomalen Bereich finden sich nur noch schmale Cytoplasmazonen zwischen Acrosomen und Zellmembran bzw. Kernmembran, die keine Organellen enthalten. Lateral vom Kern liegen die Endabschnitte der Acrosomenkappe, schmale Cytoplasmasäume und die Microtubulimanschette. In dem noch cytoplasmareichen Zellpol, von dem aus sich jetzt der Mittelteil und der Schwanz der Samenzelle formt, liegen noch verschiedene morphologisch faßbare Strukturen.

Zunächst verlängert sich, umgeben von dem peripheren Microtubulussaum, das zentrale Tubulussystem (9 + 1). Es wächst in den bereits gebildeten schwanzartigen Fortsatz aus und erreicht im reifen Spermium schließlich das Schwanzende. Gleichzeitig strömen die Mitochondrien aus der Cytoplasmaperipherie zu dieser zentralen Tubulusachse hin und beginnen sich in einer schraubigen Helix zu ordnen. Damit geht eine deutliche Verlangerung des Einzelmitochondriums einher. Später ist es dann sogar schwierig, die Enden der Mitochondrien in dieser Schraube darzustellen, so lang sind sie geworden. Die restlichen Zellorganellen, einzelne freie Ribosomen, kleine Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums und Vesikel liegen jetzt in einer tropfigen Verdickung des bereits deutlich gestreckten Mittelstückes bzw. Schwanzes.

Als weitere tiefgreifende morphologische Umwandlungen der sich entwickelnden Spermatiden müssen die Vorgänge am Kern und im sog. zentralen Komplex erwähnt werden. Der Kern verdichtet sich zunehmend. In reifen Spermien ist es dann unmöglich, einzelne Strukturen im Karyoplasma deutlich darzustellen. Zusammengefaßt lassen sich die Vorgänge etwa folgendermaßen beschreiben: Zuerst lösen sich alle Chromatinverdichtungen im Cytoplasma auf und die granulären Strukturen verschwinden. Dann verdicken sich die einzelnen Filamente, rücken immer näher zusammen und sind dann nicht mehr sicher im Bild zu trennen. - Im zentralen Komplex bildet sich zur Peripherie hin neben jedem der 9 Tubuluspaare eine homogene elektronendichte Säule, die bis zum Endabschnitt des Schwanzes reicht

und im Querschnitt eine birnenförmige Gestalt hat, wobei das stumpfe Ende nach außen ragt.

Während dieser zuletzt beschriebenen Vorgänge ist die Microtubulimenschette um den Kern und den Anfangsteil des Mittelstückes verschwunden. Der genaue Auflösungsmodus konnte nicht genau dargestellt werden, muß aber in relativ kurzer Zeit ablaufen. Auflösungsformen der Tubuli, wie Bruchstücke oder Filamente, konnten niemals nachgewiesen werden. Offenbar kommt es also zu einem schnellen Zerfall in niedermolekulare Bruchstücke, die nicht mehr elektronenmikroskopisch zu erfassen sind.

Diskussion

Bei der Durchsicht der Literatur hatte sich gezeigt, daß ein wesentlicher Vorgang während der Spermiohistogenese, die Streckung der Spermatiden bis zur Gestalt des typischen Spermiums bisher nur beschreibend berücksichtigt wurde. Eine Vorstellung über die Ursachen und Mechanismen dieses morphogenetischen Prozesses ist in der älteren Literatur höchstens in dem Sinne zu finden, daß eine passive Verformung durch die anliegenden SERTOLI-Zellen oder eine aktive Verformung durch den auswachsenden geißelähnlichen Schwanz vor sich geht (FLEMMING 1880; BENDA 1887,1900; BRANCA 1924; HELD 1916; WALDEYER 1906; MEVES 1897,1898; STIEVE 1930). Seitdem wurden diese Probleme nur wenig berücksichtigt. Erst durch die Einführung neuerer morphologischer Methoden, besonders der Elektronenmikroskopie, ist dem Problem der Zellform und ihrer Änderung erneut Aufmerksamkeit geschenkt worden. In Analogie zu vielen anderen Zellarten wurde in der Einleitung 2 Mechanismen beschrieben, die neben einer natürlich immer möglichen passiven Verformung eine aktive Formung der Zelle prägen können:
1. Das Vorhandensein eines kontraktilen Apparates in der Zelle mit Pressung des Cytoplasmas in bestimmter Richtung, d.h. also eine Fortsatzbildung entsprechend der amoeboiden Bewegung (v.KEYSERLINGK 1969,1970; WOHLFARTH-BOTTERMANN 1964).
Als 2. Möglichkeit wird ein Druckdiskutiert, der von einem Microtubulus-System ausgeübt wird. Bereits in der Einleitung wurden einige typische Beispiele für eine solche Formprägung angeführt. Am besten ist aber die Notwendigkeit von Microtubuli

für die Erhaltung der Form bei Einzellern bewiesen worden. Hier läßt sich unter bestimmten experimentellen Bedingungen (z.B. unter hohem Druck) eine Auflösung der Microtubuli erreichen, während gleichzeitig die charakteristische Form der Zellen verlorengeht (ALLEN 1967; BEHNKE and FORER 1967; KENNEDY 1969; KENNEDY and ZIMMERMANN 1970; SHELANSKI and TAYLOR 1968).

Nach unseren elektronenmikroskopischen Befunden kann mit großer Wahrscheinlichkeit behauptet werden, daß ein kontraktiles System im üblichen Sinne, also mit gerichteten Filamenten oder einem Netzwerk von Filamenten (HUXLEY 1963; SANDOW 1970; WOHLFARTH-BOTTERMANN 1968), nicht in den Spermatiden vorhanden ist. Eine Fortsatzbildung ähnlich der bei der amoeboiden Bewegung sollte also nicht angenommen werden. Diese Art der Fortsatzbildung wäre auch bei der Entstehung der typischen Spermienform wenig sinnvoll. Diese Form ist außerordentlich stabil und bleibt auch unter ungünstigen äußeren Bedingungen erhalten. Die Fortsatzbildung bei der amoeboiden Bewegung ist aber gerade durch den ständigen Wechsel, das Entstehen und wieder Verstreichen gekennzeichnet.

Der Nachweis von Microtubuli in den Spermatiden legt aber den Gedanken nahe, daß dieses Struktursystem wesentlich an der Formung beteiligt ist. Allerdings kommen zwei distinkte Systeme vor, die sich durch ihre Lokalisation in der Zelle und ihre Anordnung unterscheiden. Einmal finden sich die typischen 9 + 1 Tubuluspaare im Zentrum der sich verlängernden Zellen, ausgehend vom hinteren Centriol. Diese Anordnung

entspricht der in allen anderen Kinocilien (BROWN and BERTKE 1969). Das sogenannte Ciliensystem der Tubuli kann jedoch nicht für die Verformung der Spermatiden während der Spermiohistogenese verantwortlich gemacht werden. Es besteht nämlich eine deutliche zeitliche Verzögerung zwischen Formänderung und Auswachsen des 9 + 1 Systems. Während bereits eine deutliche Polarisierung der Zellen mit deutlicher Verlängerung eintritt, beginnt erst das zentrale Tubulusbündel auszuwachsen. Darüber hinaus kann die Wachstumsspitze nicht aktiv drücken, da sie zunächst in eine Vakuole hineinwächst und erst diesen Hohlraum halbmondförmig zusammenschiebt. Dieser Hohlraum sitzt dann kappenförmig der Spitze des zentralen Tubulusbündels auf und wird mit der Verlängerung dieses Systems schwanzwärts geschoben. Eine Beteiligung dieser Microtubulusart an der Verformung der Spermatiden ist also wenig wahrscheinlich.

Ähnliches gilt auch für eine Struktur, die erst nach Ausbildung des 9 + 1-Systems peripher von jedem Tubuluspaar als säulenartige elektronendichte Struktur entsteht. Für eine Beteilung am Verformungsprozeß kommen diese Verdichtungen deshalb auch nicht in Betracht. Allerdings müssen sowohl die 9 + 1-Tubuluspaare für andere wichtige Funktionen verantwortlich gemacht werden: Für die Stabilisierung der Form nach Bildung des Schwanzes und für die Bewegung des Spermienschwanzes. Da der Spermienschwanz als Sonderform einer Kinocilie betrachtet werden kann, ist die Annahme berechtigt, daß die Bewegungen des Schwanzes durch das 9 + 1-Tubulussystem bewirkt werden. Die Beteiligung des 9 + 1-Tubulussystems an der

Bewegung der Cilien ist inzwischen sicher nachgewiesen (BROWN and BEHNKE 1969). Als Funktion der peripheren Saulen kann man dagegen die Stabilisierung ansehen.

Für die Prägung der Form der Spermatiden kann auf der Grundlage der bisher diskutierten Überlegungen die Manschette aus Microtubuli verantwortlich gemacht werden. Dafur spricht die zeitliche Kongruenz zwischen Auftreten der Microtubulus-Manschette und Zellverformung sowie die Lokalisation der Microtubuli. Am Beginn der Streckung der Spermatiden lassen sich bereits Microtubuli nachweisen. Sie treten neben dem Nucleus auf, wo auch die erste Streckung faßbar wird. Mit der Verlängerung dieser Microtubuli schreitet auch die Streckung und Verlängerung fort.

Die Bildung und die Verlangerung der Microtubuli ist morphologisch in seinem Mechanismus nicht sicher faßbar. Zweifellos bestehen die Microtubuli oder ihre Bausteine, seien sie filamentär oder granulär, aus Proteinen (BEHNKE and FORER 1967; BENSCH and MALAWISTA 1969; HOLMES and CHOPPIN 1968; KENNEDY 1969; RENAULD et al.1968; SHELANSKY and TAYLOR 1968). Es muß deshalb angenommen werden, daß sie an den freien Ribosomen des Cytoplasmas gebildet werden. Tatsächlich kommen während der Bildung der Microtubuli zahlreiche freien Ribosomen vor. Wie allerdings die Verlängerung und unser eigentliches Problem - die Streckung der Zellen - vor sich geht, ist allein nicht morphologisch zu entscheiden. Es gibt zur Erklärung dieser Microtubuli-Wirkung zwei Mechanismen: 1. der rein mechanische Druck der Microtubuli und 2. ein mehr

indirekter Mechanismus, bedingt durch Flüssigkeitsströme. Dabei wird unterstellt, daß in Analogie zu den Neurotubuli in Axonen ein Flüssigkeitstransport in diesen Rohren vor sich geht. Dieser Strom konnte natürlich nur dann die Form der Zellen bestimmen, wenn der Fluß über eine gewisse Zeit stetig erfolgt. Voraussetzung für derartige Überlegungen ist außerdem, daß im Axon tatsächlich eine Flussigkeitsbewegung in den Neurotubuli stattfindet. Derartige Transportvorgänge spielen sich zweifellos im Axon ab, jedoch ist noch nicht völlig sicher, ob der Transport in den Tubuli stattfindet.

Diese Befunde weisen deutlich darauf hin, daß der Anfang der Zellstreckung durch die periphere Tubulusmanschette geprägt wird. Allerdings kann das eigentlich Schwanzwachstum über diesen Mechanismus nicht erklärt werden. Dafür müssen wahrscheinlich doch die zentralen 9 + 1-Tubuluspaare verantwortlich gemacht werden, da spätestens in der Mitte des Mittelstückes die Tubulusmanschette endet. Man kann deshalb die Formung der Spermatocyten II. Ordnung zu reifen Spermien in verschiedene Phasen zerlegen: Zunächst muß die Polarität der Zelle geprägt werden. Die eigentlichen Ursachen dafür sind unbekannt, jedoch kann man vermuten, daß in Analogie zur Zellteilung die Centriolen bei solchen Symmetrieeinstellungen eine Rolle spielen. Die Bedeutung des Golgi-Apparates als Gegenpol zu den Centriolen mit dem sich daraus entwickelnden Acrosom kann natürlich dabei nicht sicher abgeschätzt werden. Über dieses Probelm läßt sich also trotz Darstellung der Feinstruktur nichts sicheres aussagen. Man kann zwar die deutlich

polare Anordnung der Organellen beschreiben, ohne dabei aber die zugrundeliegenden Kräfte für diese Anordnung zu erkennen. Als 2. Phase folgt der Beginn der Verformung durch die Microtubulusmanschette. Ist eine gestreckte Form erreicht, wird das zentrale 9 + 1-Tubulus-System entwickelt, das den Spermienschwanz bildet.

Die elektronenmikroskopische Forschung erlaubt also viel genauer, die morphogenetischen Vorgänge während der Spermienreifung zu verfolgen. Es gelingt dabei, diese Sequenz in zahlreiche Einzelschritte zu zerlegen. Der Mechanismus der Zellverformung bzw. Streckung wird dabei dem Verständnis näher gebracht. Die Ursachen und der Mechanismus der Richtungsprägung bleibt aber - wie oben diskutiert - im Dunklen. Jeder der morphologisch faßbaren Einzelschritte kann aber zweifellos isoliert gestört werden. Hier ist noch eine Fülle von Arbeit zu leisten, um Reifungsstörungen der Samenzellen auf einzelne bestimmte Punkte zu beziehen. Die genaue Kenntnis der normalen Entwicklung ist aber Anfang und Grundlage solcher Bemühungen.

Zusammenfassung

Die Verformung der Samenzellen von Ratten während der Spermatidenentwicklung wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Von den diskutierten Ursachen und Mechanismen, die für die Streckung und auch Stabilisierung dieser Streckung während der Spermiohistogenese in Frage kommen, spielen die Microtubuli in der Peripherie des perinucleären Anteiles der Zelle eine wichtige Rolle. Diese sogenannte Microtubuli-Manschette prägt in Analogie zu ähnlichen Formänderungen bei anderen Zellarten den Beginn der Streckung. Sie besteht aus mehreren Microtubuli-Lamellen , jedes Einzelrohr ist 350 Å breit, hat eine lichte Weite von 160-200 Å und eine Wandstärk von 90 Å. Die Veranderungen und Bewegungen der Zellorganellen während dieser Zeit werden beschrieben. Das Auswachsen der 9 + 1 zentralen Microtubulus-Paare einschließlich der 9 anliegenden Säulenstrukturen ist für die endgültige Formung des Schwanzes und seine Stabilisierung verantwortlich zu machen. Die Ursachen und Kräfte, von denen die Lokalisation und Stellung der Centriolen und damit die Richtung der Streck gesteuert wird, lassen sich morphologisch nicht darstellen.

Abb. 1

Spermatocyten II. Ordnung vor Vollendung der cytoplasmatischen Trennung nach der 2. Reifeteilung mit peripher angeordneten Crista-armen Mitochondrien (M) und noch zusammenhängenden Cytoplasmaleibern (↓). Basophiler Einschluß (B), multivesikulärer Körper (X), N = Nucleus, endoplasmatisches Retikulum (o), SERTOLI-Zellfortsatz (S).

Vergrößerung 1 : 21 000

μ
N
N
N
S

Abb. 2

Spermatiden am Beginn der Streckung. Im bereits ovalen Kern (N) gleichmäßig verteilte Kernstrukturen. Acrosomenkappe (x), Centriol = C, perinucleäre Microtubulimanschette = MA, Mitochondrien (M), SERTOLI-Zellen = S.

Vergrößerung 1 : 28 ooo

μ
M
M
N
N

Abb. 3

Spermatid während der Streckung. Centriol (C) bereits von einem halbmondförmigen Hohlraum umgeben.
* = erweiterte endoplasmatische Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums der SERTOLI-Zellen (S), perinucleären Microtubulus-Manschette (MA), Mitochondrien (M), Nucleus (N), Acrosomenkappe (X), Cytoplasmawulst mit Anfang der perinucleären Microtubulus-Manschette (↓).

Vergrößerung 1 : 35 000

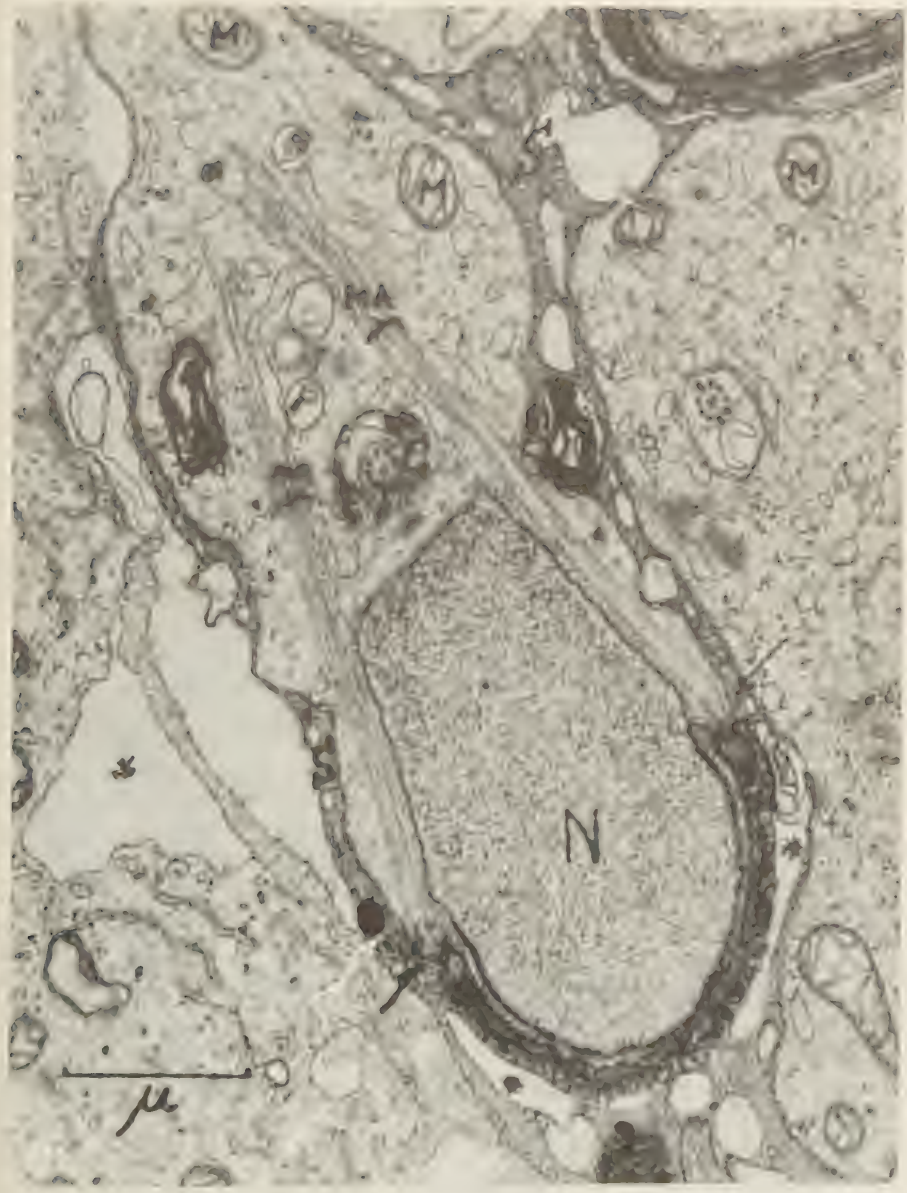
M
M
M
MA
N
μ

Abb. 4

Spermatiden während der Streckung in Schrägschnitten. Microtubuli der perinucleären Manschette in Schräg- und Querschnitten (MA). Mitochondrien der SERTOLI-Zellen (MS) und der Spermatiden (M), Nucleus (N), Acrosom (X), erweiterte Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums der SERTOLI-Zellen (*).

Vergrößerung 1 : 35 000

N
N
N
MA
MA
MA

Abb. 5

Spätere Halsregion von Spermatiden mit beginnender Hohlraumbildung um das Centriol (C 1) und den Centriolenkomplex (C 2). Perinucleäre Manschette (MA), Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums (X), SERTOLI-Zellenfortsatz (S), Nucleus (N).

Vergrößerung 1 : 56 ooo

μ
MR
S
N
S
L
MR
N

Abb. 6

Ausschnittsvergrößerung von Abb. 3. Hohlraumbildung um das Centriol (C), deutliche Darstellung der Feinstruktur der Microtubuli (↓), Cytoplasma der SERTOLI-Zellen (S) mit Myelinstrukturen (X), Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums (*), Nucleus (N), freie Ribosomen (O).

Vergrößerung 1 : 82 000

N

Abb. 7

Hohe Vergrößerung der Microtubuli im Schrägschnitt. Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums (X), freie Ribosomen (O), Nucleus (N).

Vergrößerung 1 : 88 ooo

Abb. 8

Perinucleäre Microtubulus-Manschette im Querschnitt.
SERTOLI-Zellcytoplasma (S), Nucleus (N).

Vergrößerung 1 : 80 ooo

M
S
N
S

Abb. 9

Bereits deutlich gestreckte Spermatide mit auswachsendem 9 + 1-Microtubulus-System (↓), weit caudal reichende Microtubulus-Manschette (MA), Mitochondrien (M), schmale SERTOLI-Lamelle (X), Centriolenkomplex (C).

Vergrößerung 1 : 35 ooo

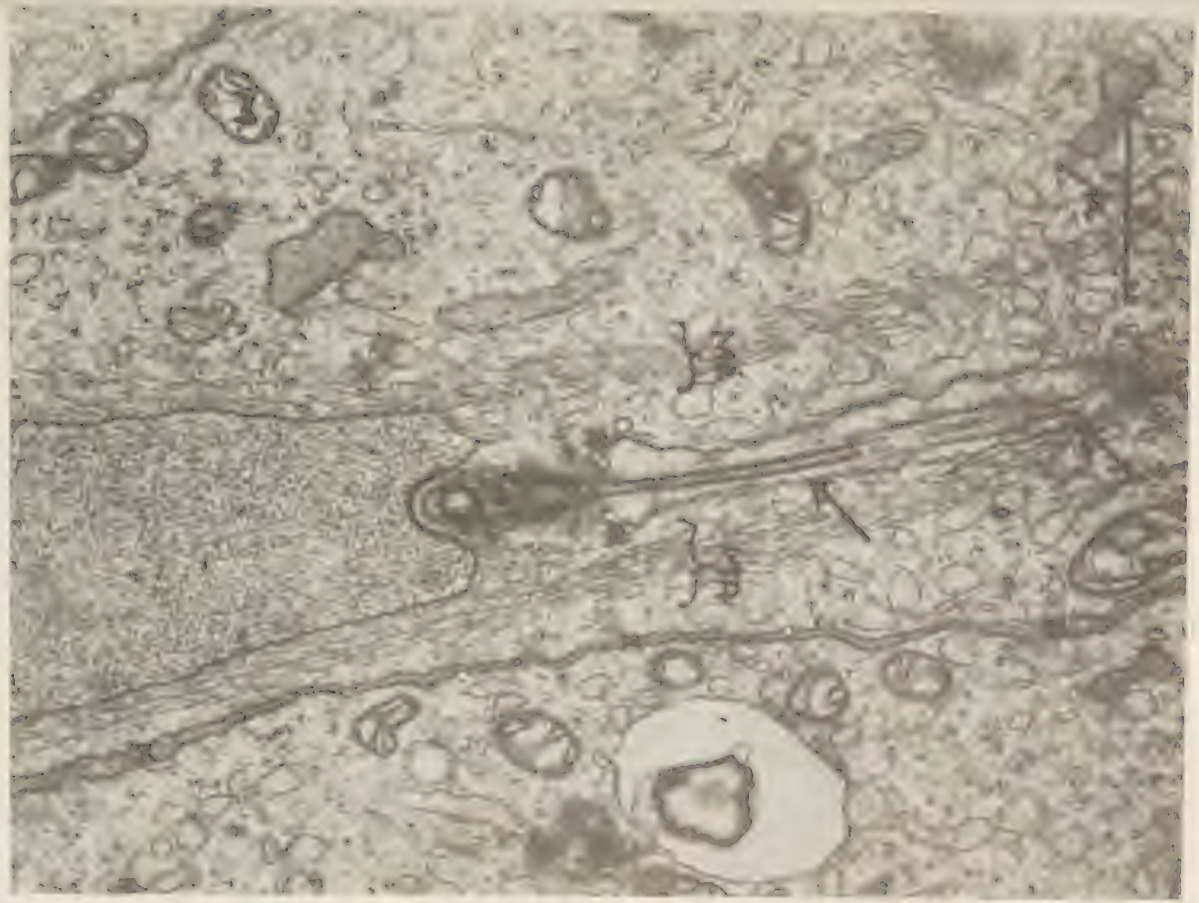

Abb. 10

Spätes Stadium der Spermatidenreifung. Mitochondrien (↓) bereits um den zentralen Komplex (X) angeordnet. Keine Microtubulus-Manschette mehr nachweisbar, isolierendes SERTOLI-Zellcytoplasma (S).

Vergrößerung 1 : 22 ooo

S
S
S
S

Literatur

ALLEN,R.D.: Fine structure, reconstruction and possible function of components of the cortex of tetrahymena pyriformis. J.Protozool. 14,553 (1967)

BEDFORD,J.M.: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. J.exp.Zool. 163,319-330 (1966)

BEHNKE,O. FORER,A. : Evidence for four classes of microtubules in individual cells. J.Cell Sci. 2, 169 (1967)

BENDA,C. : Zur Spermatogenese und Hodenstruktur der Wirbeltiere. Anat.Anz. 2, 368-371 (1887)

- : Über neue Darstellungsmethoden der Zentralkörperchen und die Verwandtschaft der Basalkörper der Cilien mit Zentralkörperchen. Arch.f.Physiol. 1901, 147-157

BENSCH,K.G. MALAWISTA,S.E.: Microtubular crystals in mammalian cells. J.Cell Biol. 40,95-102 (1969)

BOUCK,G.B.: BROWN,D.L. Microtubule genesis and cell shape. J.Cell Biol. 47, 22a (1970)

BRANCA,A.: Les canalicules testiculaires et la spermatogenèse de l'homme. Arch. de Zool. 62,53-252 (1924)

BROWN,W.V. BERTKE,E.M.: Textbook of Cytology. The C.V.Mosby Company 1969, 292-308

DeKRETSER,D.M.: Ultrastructural Features of Human Spermiogenes Zt.f.Zellforsch. 98,477-505 (1969)

FAWCETT,D.W.: The anatomy of the mammalian spermatozoon with particules reference to the guinea pig. Z.Zellforsch. 67,279-296 (1965)

FAWCETT,D.W. ITO,S.: The fine structure of bat spermatozoa. Am.J.Anat. 116, 567-610 (1965)

FAWCETT,D.W. PHILLIPS,D.M.: The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. Anat.Rec. 165, 153-183 (1969)

FAWCETT,D.W. EDDY,E.M. PHILLIPS,D.M.: Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. Biol. of Reproduction 2, 129-142 (1969)

FLEMMING,W.: Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. Arch.mikroskop.Anat. 18,151-259 (1880)

FUJITA,T.
MIYOSHI,M.
TOKUNAGA,J.: Scanning and transmission electron microscopy of human ejaculate spermatozoa with special reference to their abnormal forms. Z.Zellforsch. 105,483-497 (1970)

HANCOCK,J.L.: The sperm cell. Science J. 6, 31 (1970)

HEALEY,P.: Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. J.Reproduction Fertility 18,21 (1969)

HELD,H.: Mikrosomen der Spermien von Mensch und Meerschwein. Ber.Verh.Ges.Wiss.Leipzig (Math.-phys.Klasse) 68,205-216 (1916)

HEPLER,P.K.
JACKSON,W.T.: Microtubules and early stages of cell-plate formation in the endosperm of HAEMANKANTHU KATHERINAE BAKER. J.Cell Biol. 38,437-446 (1968)

HILSCHER,W.
HILSCHER,B.: Autoradiographische Untersuchungen über die Kinetik der Spermatogenese der Wistarratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermatocytogenese. Z.Zellforsch. 96, 625-640 (1969)

HILSCHER,B.
HILSCHER,W.
MAURER,W.: Autoradiographische Bestimmungen der Generationszeiten und Teilphasen der verschiedenen Spermatogonien-Generationen der Ratte. Naturwissenschaften 53, 415-416 (1966)

HOLMES,K.V.
CHOPPIN,P.W.: On the role of microtubules in movement and aligument of nuclei in virus-induced synaptia. J.Cell Biol. 39, 526-543 (1968)

HUXLEY,H.E.: Electron microscopic studies on the structure of natural and synthetic Protein filaments from striated muscle. J.Mol.Biol. 7, 281-308 (1963)

KAYE,J.S.
McMASTER-KAYE,R.: The fine structure and chemical composition of nucleiduring spermiogenesis in the house cricket. I. Initial stages of differentiation and the loss of Non-histone Protein. J.Cell Biol. 31,159-179 (1966)

KENNEDY,J.R.: In: The cell cycle. Gene-enzyme interactions. (Edts.G.M.PADILLA, G.L.WHITSON and I.L.CAMERON). Acad.Press,New York 1969, 227

KENNEDY,J.R.
ZIMMERMAN,A.M.: The effects of high hydrostatic pressure on the microtubules of tetrahymena pyriformis. J.Cell Biol. 47, 568-576 (1970)

von KEYSERLINGK,D.: Kontraktilität und Ultrastruktur glycerinextrahierter Fibroblasten aus der Gewebekultur. Protoplasma 67, 391-406 (1969)

\- : Über die Bedeutung des intracellulären, kontraktilen Systems für die Lokomotion der Fibroblasten. Cytobiologie 1,259-272 (1970)

MEVES,F.: Über die Entwicklung der männlichen Geschlechtszellen von Salamandra maculosa. Arch.Mikroskop.Anat. 48, 1-83 (1897)

\- : Zur Entstehung der Achsenfäden menschlicher Spermatozoen. Anat.Anz. 14, 168-170 (1898)

NICANDER,L.
BANE,A.: Fine structure of the sperm head in some mammals, with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. Z.Zellforsch. 72, 496-515 (1966)

NICANDER,L.
PLÖEN,L.: Fine structure of spermatogonia and primary spermatocytes in rabbits. Z.Zellforsch. 99, 221-234 (1969)

OLAH,L.V.: Some new aspects of the microtubular organization of the mitotic spindle and the phragmoplast spindle. Cytologia 34, 163-168 (1969)

PEDERSEN,H.: Ultrastructure of the ejaculated human sperm. Z.Zellforsch. 94, 542-555 (1969)

QUINN,P.J.
WHITE,J.G.
CLELAND,K.W.: Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold chock and freezing. J.Reproduction Fertility 18,209 (1969)

RENAUD,F.L.
ROWE,A.J.
GIBBONS,I.R.: Some properties of the protein forming the outer fibers of cilia. J.Cell Biol. 36,79-90 (1968)

ROOIJ,D.G.
KRAMER,M.F.: Spermatogonial stem cell renewal in the rat, mouse and golden hamster. A study with the alkylating agent myeleran. Z.Zellforsch. 92,400-405 (1968)

SAACKE,R.G.
ALMQVIST,J.O.: Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal ejaculated sperm. Am.J.Anat. 115, 143-162 (1964)

SANDROW,A.: Skeletal muscle. Ann.Rev.Physiol. 32, 87-124 (1970)

SHELANSKI,M.L.
TAYLOR,E.W.: Properties of the protein subunit of central-pair and outer-doublet microtubules of sca urchin flagella. J.Cell Biol. 38, 304-315 (1968)

SOLL,D.R.
BROMBERG,R.
SONNEBORN,D.R.: Zoospore germination in the water mold, Blastocladiella emersonii. I. Measurement of germination and sequence of subcellular morphological changes.
Deo.Biol. 20,183-217 (1967)

STIVE,H.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd 7/II, Männliche Genitalorgane.
Springer-Verlag Berlin 1930

TILNEY,L.G.
GIBBINS,J.R.: Microtubules and filaments in the filopodia of the secondary mesenchyme cells of Arbacia punctulata and Echinarachnius parma.
J.Cell Science 5, 195 (1969)

VITALE-CALPE,R.: Ultrastructural studies of spontaneous spermiation in the guinea pig.
Z.Zellforsch. 105, 222-233 (1970)

WALDEYER,W.: Die Geschlechtszellen.
Handb.d.vergl.und exp.Entwicklungslehre der Säugetiere (O.HERTWIG) Bd.1,Teil 1, 1.Hälfte, 86-476. G.Fischer,Jena 1906

WARREN,R.H.: The effect of colchicine on myogenesis in vivo in rana pipiens and Rhodnius prolixus (HEMIPTERA)
J.Cell Biol. 39, 544-555 (1968)

WHITE,J.G.: The submembrane filaments of blood platelets.
Amer.J.Pathol. 56, 267 (1969)

WOHLFAHRT-BOTTERMANN,K.E.: Cell structures and their significance for ameboid movement.
Internat.Rev.Cytol. 16, 61-132 (1964)

- - : Dynamik der Zelle.
Mikroskopie 23, 61-96 (1968)

WOOLLEY,D.H.: The midpiece of the mouse spermatozoon: its form and development as seen by surface replication.
J.Cell Science 6, 865 (1970)

L e b e n s l a u f

Ich A h m a d G h a z i geb.am 29.4.31 in Neyscabour/Iran habe sieben Geschwister.Mein Vater war in Persien Landbesitzer.Er ist 1931 verstorbe Meine Mutter ist im Jahre 1942 verstorben.

Ich habe in Persien die Volksschule und dann die Höhere Schule bis zur Absolvierung des Abiturs durchgemacht.Danach 3 Semester Jura studiert. Da ich großes Interesse hatte an der Medizin,änderte ich mein Fach und kam im Dezember 1954 nach Deutschland.

Bis April 1955 nahm ich an einem deutschen Sprachkursus teil und ließ mich am 29 April 1955 an der Universität Mainz bei der Medizinischen Fakultät immatrikulieren.

Im August 1957 habe ich mein Physikum bestanden und ein Semester Klinik in Mainz absolviert.

Ich kam dann nach Berlin, um dort meinen Urlaub zu verleben,Hier lernte ich meine Frau kennen und entschloß mich,weiter in Berlin zu studieren. Während des studiums durfte ich auf Grund einer Bestimmung des Persisch Konsulats nicht heiraten.

Im Februar 1959 wurde meine Tochter Babette geboren.Am 18 Juli 61 beend ich mein Staatsexamen und konnte dann am 10.10.1961 heiraten.

Nach meinem Staatsexamen,habe ich meine Medizinalassistentenzeit ein Ja in der Innere,4 Monate Gyn. 6 Monate Chir.und 3 Monate in der Kinderkli gearbeitet.Weiterhin habe ich 6 monate auf der Chir.und ein Jahr auf di Inn.Abt. und zusätzlich laufend Praxisvertretung gemacht.Bis Juni/1965 habe ich die Praxis,die ich 2 Jahre ununterbrochen vertreten,habe Übernommen,und bis jetzt arbeite ich in meiner eigene Praxis als prak.Arzt.

Ahmad Ghazi